

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. H.-B. Wuermeling

**Einfluß von Natriumchlorid
auf die hydrolytische und enzymatische
Spaltung von Paraoxon
(E-600,O,O-Diäthyl-O-p-nitrophenyl-phosphat)**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Dr. med. Jürgen H. Weisser
aus Friedberg

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. H.-B. Wuermeling

**Einfluß von Natriumchlorid
auf die hydrolytische und enzymatische
Spaltung von Paraoxon
(E-600,O,O-Diäthyl-O-p-nitrophenyl-phosphat)**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Dr. med. Jürgen H. Weisser
aus Friedberg

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen.- Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. Kersten

Referentin: Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v.Mallinckrodt

Korreferent: Prof. Dr. H.-B. Wuermeling

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Februar 1980

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
II. Enzymatischer Abbau von Parathion	6
III. Problemstellung	14
IV. Eigene Untersuchungen	21
A. Darstellung der Methodik und des Materials	21
B. Versuchsergebnisse	26
1. Präzision	26
2. Prüfung eines Einflusses von Natriumchlorid allein auf die Paraoxon-Spaltung	28
3. Ermittlung des Einflusses von Natriumchlorid auf die enzymatische Spaltung von Paraoxon durch menschliches Serum, gemessen nach Krisch	30
V. Diskussion und Zusammenfassung	45
VI. Literaturverzeichnis	47



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I. Einleitung

Die organischen Phosphorsäureverbindungen werden vor allem in der Land- und Forstwirtschaft als Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel verwendet. Bei den Alkylphosphaten handelt es sich um gut wirksame Kontakt-, Fraß- und Inhalationsgifte gegen Insekten. Eine wichtige Voraussetzung für die starke Wirksamkeit ist die gute Fett- und Lipoidlöslichkeit. Von den zahlreichen Präparaten möchte ich folgende aufführen: E 605 forte (Parathion), Gusathion, Metasystox - R, Endocide - R, Ultracid, Folimat und Phosdrin.

Infolge fahrlässiger Anwendung treten vor allem in ländlichen Gegenden häufiger Vergiftungen auf. Doch ist auch hinreichend oft von Suiziden und Morden mit E 605 berichtet worden. Die tödliche orale Dosis für Parathion wird mit 300 - 500 mg für Erwachsene angegeben. Für einen Todeseintritt durch percutane Aufnahme ist etwa die zehnfache Menge erforderlich (etwa 3 g). Für Säuglinge und kleine Kinder liegt die letale Dosis wesentlich niedriger.

Die Zeitspanne zwischen der Giftaufnahme und dem Auftreten der ersten Symptome hängt zunächst von der Applikationsart ab: Die Aufnahme per inhalationem führt im allgemeinen schneller zu Vergiftungserscheinungen als eine perorale, und diese wiederum schneller als die percutane Aufnahme

des Giftes. Bei der peroralen Aufnahme spielen allerdings der Füllungszustand des Magens, die Anwesenheit von Vehikeln und der gleichzeitige Genuß von Alkohol eine Rolle.

Bei der Aufnahme von Alkylphosphaten per inhalationem vergehen in der Regel 0 bis 20 Minuten, bei der peroralen Aufnahme 10 Minuten bis 2 Stunden und bei der percutanen 2 bis 6 Stunden bis zum Wirkungseintritt.

Die Giftwirkung aller organischen Phosphorsäureverbindungen beruht darauf, daß sie die Acetylcholinesterase und andere Cholinesterasen im Blut und in den Geweben blockieren, indem sie diese durch Phosphorylierung hemmen und somit den Abbau des körpereigenen Acetylcholins verhindern. Die Symptome gehen daher auf die Anhäufung von Acetylcholin zurück, man spricht von einer endogenen Acetylcholinvergiftung.

Die akuten Intoxikationserscheinungen lassen sich in drei Gruppen gliedern:

1. Muscarinartige Symptome werden beobachtet als Folge der Wirkung auf die postganglionären cholinergischen Nerven des vegetativen Nervensystems mit übermäßiger Reizung der entsprechenden Erfolgsorgane.

2. Nicotinartige Symptome treten auf infolge einer Wirkung auf die vegetativen Ganglien und die motorischen Nervenendplatten, die zunächst zu Erregung und später zu Lähmung führt.

3. Wirkung auf das Zentralnervensystem ebenfalls mit anfänglicher Erregung und nachfolgender starker Hemmung.

Der muscarinähnliche Effekt ist das erste Zeichen der Vergiftung. Infolgedessen sind die ersten Symptome Anorexie und Nausea. Diese werden gefolgt von Abdominalkrämpfen, exzessivem Schwitzen, Speichelfluß, vermehrtem Tränenfluß und manchmal einer Pupillenverengung. Erbrechen fehlt häufig. War die Exposition eine stärkere, dann kommt es zu Diarrhöen, Tenesmen, unwillkürlichem Abgang von Stuhl und Urin, Bläßwerden der Haut, stecknadelkopfgroßen, nicht mehr auf Licht reagierenden Pupillen, verschwommenem Sehen, excessiver Bronchialsekretion, asthmaähnlicher Atmungserschwerung und Lungenödem mit Zyanose. Wenn Gift-spray eingeatmet wurde, sind die Atembeschwerden besonders schwer. Der Blutdruck ist bei schweren Intoxikationen gewöhnlich erhöht. Im weiteren Verlauf treten nun die nicotinähnlichen Wirkungen in den Vordergrund. Es treten zunächst in den Augenlidern und der Zungenmuskulatur fibrilläre Zuckungen auf. Diese greifen auf die Gesichts- und Nackenmuskulatur und die Augenmuskeln über, was zu ruckartigen Bewegungen der Bulbi führt. Es kommt zu generalisierten Muskelzuckungen und Myasthenie. Hiervon sind auch das Zwerchfell und die übrige Atemmuskulatur befallen. Die Wirkung auf das Zentralnervensystem, dessen Cholinesterase ja ebenfalls blockiert wird, zeigt sich in Ruhelosigkeit, Angst und Schwindel. Dann folgen schwere, durch Analgetika nicht zu beeinflussende Kopfschmerzen und Schlaf-

losigkeit. Bei schweren Vergiftungen treten Ataxie, Tremor, Konzentrationsschwäche, Verwirrheitszustände und gelegentlich Desorientiertheit auf. Es kommt zu Wortfindungsstörungen und Hesitieren. Daran schließen sich bei den schwersten Fällen Koma, Verschwinden aller Reflexe und generalisierte Krämpfe an. Die Todesursache ist meist ein Atemstillstand durch zentrale Schädigung oder Bronchospasmus.

Bei Todesfällen durch Alkylphosphate ist der Sektionsbefund nicht charakteristisch. Es fallen jedoch oftmals ein durch ein Lungenödem auftretender Schaumpilz vor Mund und Nase, dunkelblaurote bis blaugrüne Totenflecken (Gefäßerweiterung durch Acetylcholin) und die in Streckstellung bei exzessiver Totenstarre fixierten Füße mit hakenförmiger Dorsalflexion der Großzehe auf.

Im allgemeinen treten die klinischen Erscheinungen erst auf, wenn die Serumcholinesterase um etwa 75% gehemmt ist. Somit gibt die Bestimmung der Serumcholinesterase-Aktivität ein gutes Maß für den Grad der Vergiftung oder der Exposition. Die Herabsetzung der Cholinesteraseaktivität findet man auch in den Erythrozyten und im Gehirn, dort besonders im Corpus striatum.

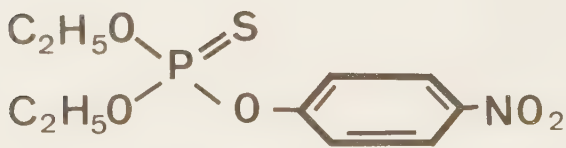
Man muß allerdings wissen, daß in der Bevölkerung Personen mit genetisch sehr niedriger Serum-Cholinesterase zu finden sind. Diese kann sogar völlig fehlen (silent gene).

Der Nachweis der Organophosphate kann im Blut, im Urin, in den Organen und im Mageninhalt, hier oft auch noch nach Exhumierung, erfolgen.

II. Enzymatischer Abbau von Parathion

Der Organophosphorsäureester E 605 (Parathion) gehört zu den "ältesten" modernen Pflanzenschutzmitteln und hat nach wie vor erhebliche Bedeutung. Es handelt sich um O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-thiophosphat.

Abb. 1



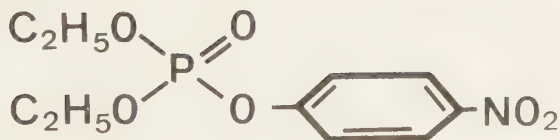
E 605 (PARATHION)

Der eigentliche Wirkstoff ist von gelbbrauner Farbe und riecht lachartig. In Handelspräparaten wird er meist mit einer Schutzfarbe (blau) versehen.

Die 50%ige Lösung wird als E 605 forte bezeichnet.

Parathion (E 605) in den Handelspräparaten ist für den Warmblüter relativ untoxisch. Erst im Organismus wird der zweiwertige Schwefel durch ein Atom Sauerstoff ersetzt, und damit entsteht der wirksame Cholinesterase-hemmstoff, O,O-Diäthyl-O-p-nitrophenyl-phosphat, auch Paraoxon oder E 600 genannt.

Abb. 2



E 600 (PARAOXON)

Dieser Vorgang ist ein Beispiel für die sogenannte "Giftung" durch Stoffwechselvorgänge.

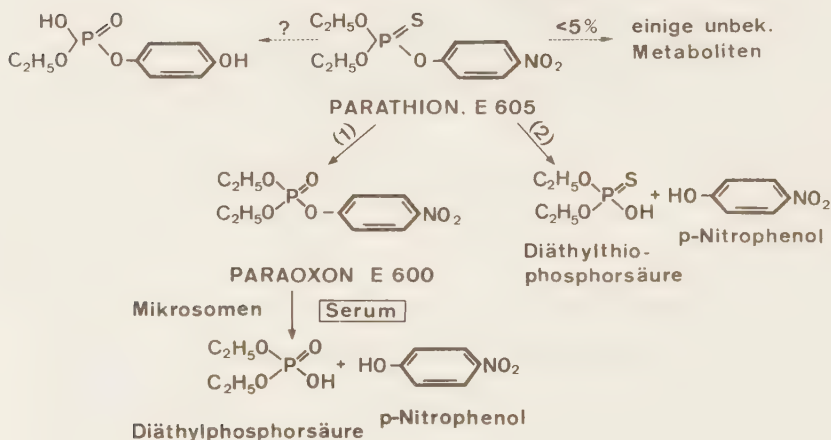
Man spricht grundsätzlich dann von Giftung, wenn erst im Körper die wirksame giftige Substanz entsteht. Häufiger ist allerdings, daß im Organismus durch Metabolisierung und Konjugation mit Glukuronsäure eine bessere Wasserlöslichkeit und damit gleichzeitig eine Entgiftung von Stoffen erreicht wird.

NEAL (1971) und später POORE und NEAL (1972) haben den Stoffwechsel von Parathion bei Warmblüter und Mensch untersucht.

Die bisher bekannten Umsetzungen von Parathion sind in der folgenden Abbildung dargestellt:

Abb. 3:

Stoffwechsel von PARATHION im Warmblüter



Der Stoffwechsel von Parathion beim Warmblüter findet sicher zu einem erheblichen Teil in der Leber statt.

Nach der Resorption wird Parathion in der Leber zu Paraoxon oxydiert.

Erst in dieser Form hemmt es die Cholinesterase.

Paraoxon wird dann durch Enzyme hydrolytisch gespalten.

Das freigesetzte p-Nitrophenol wird an Glukuronsäure gekoppelt und im Harn ausgeschieden.

Die Freisetzung von p-Nitrophenol wird in Blut und Harn nachweisbar.

Ein weiterer Weg ist die Abspaltung einer Äthylgruppe.

Früher wurden die Enzyme des Serums "Allgemeine Esterasen" genannt.

ALDRIDGE (1953 a) charakterisierte diese Enzyme genauer und fand zwei Typen von Serumesterasen, die p-Nitrophenylacetat, -propionat und -butyrat spalten.

Er teilte sie hinsichtlich ihrer Hemmbarkeit durch E 600 in A- und B-Esterasen ein.

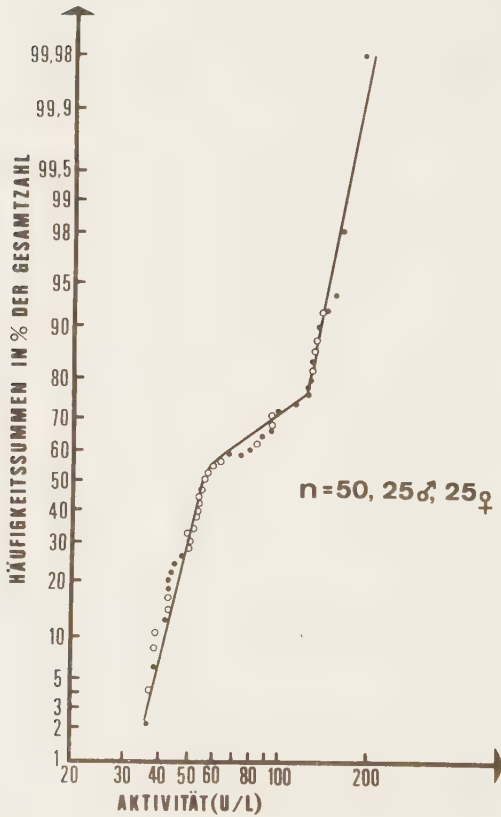
Das Enzym, welches durch organische Phosphorsäureester (Paraoxon) nicht gehemmt wird, nannte er A-Esterase, das andere, gegen Paraoxon empfindliche Enzym B-Esterase.

Nach ALDRIDGE (1953 b) ist die E 600 spaltende Aktivität des Serums (Paraoxonase) mit der aromatische Ester (wie z.B. p-Nitrophenylacetat) hydrolysierenden sogenannten A-Esterase identisch.

Daß das menschliche Serum in unterschiedlicher Weise in der Lage ist, Paraoxon hydrolytisch zu spalten, stellte KRISCH (1968) fest.

Mittels einer einfachen spektrophotometrischen Methode, die die Abspaltung von p-Nitrophenol aus Paraoxon mißt, konnte er bei 50 Personen, je 25 gesunden Männern und Frauen, zeigen, daß im pH-Optimum der enzymatischen Hydrolyse von Paraoxon (pH 11,2) Personen mit unterschiedlichen Enzymaktivitäten im Bereich von etwa 30 bis 200 U/l vorhanden sind.

Abb. 4: Normalwerte der E 600 spaltenden Aktivität im Serum, gemessen mit einer einfachen spektrophotometrischen Methode nach KRISCH (1968)



Die Werte wurden zur Ermittlung des Verteilungstyps in ein Wahrscheinlichkeitsnetz aufgetragen (Abszisse loga-

rithmisch, Ordinate nach dem Gausschen Integral geteilt) (KRISCH 1968).

Aufgrund dieser Ergebnisse hat KRISCH (1968) hinsichtlich der Serumparaoxonase-Aktivität die Normalpersonen in zwei sich überlagernde Gruppen eingeteilt.

Dabei handelt es sich um logarithmisch normale Verteilungen. Die prozentuale Verteilung auf die beiden Gruppen ist bei Männern und Frauen fast gleich. Geschlechtsunterschiede in der Fermentaktivität wurden bei den Untersuchungen an 50 Personen beiderlei Geschlechts nicht bemerkt. KRISCH (1968) konnte mit diesem Verfahren im Einzelfall wegen des großen Überlagerungsbereiches oft nicht sicher unterscheiden, zu welcher der beiden Gruppen eine Versuchsperson gehört.

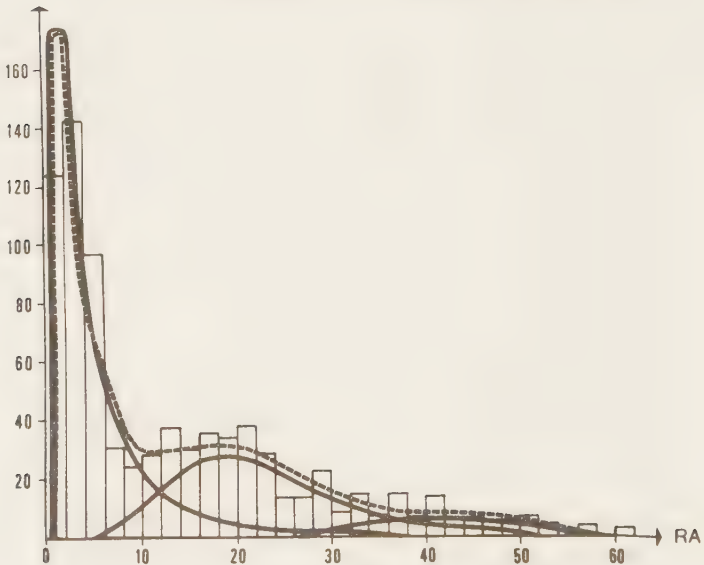
Mehrere Autoren haben die Untersuchungen an größeren Kollektiven weitergeführt und gefunden, daß noch sehr viel höhere Aktivitäten bis 500 U/l vorkommen.

GELDMACHER - v. MALLINCKRODT et al. (1973 a) nahm an, daß die gefundenen Aktivitäten nicht das Bild einer bimodalen Verteilung zeigen, sondern ein Polymorphismus mit drei Aktivitätsgruppen vorliegt.

Familienuntersuchungen an 100 Familien mit 180 Kindern wiesen darauf hin, daß dieser Polymorphismus genetisch bedingt ist und möglicherweise einem intermediären Erbgang folgt (GELDMACHER - v. MALLINCKRODT et al. 1973 a, DUMBACH 1976). Dabei gelangte eine andere Methode, die Anti-Che-Technik, zur Anwendung.

Doch auch mit dieser Methode kann nicht jedes Serum einer bestimmten Gruppe sicher zugeordnet werden, weil zwischen den einzelnen Gruppen ein großer Überlagerungsbereich besteht.

Abb. 5: Polymorphismus der menschlichen Serumparaoxonase-Aktivität, gemessen mit der Anti-Che-Technik



DUMBACH (1976) hat mit dieser Technik die Verteilung der drei Serumparaoxonase-Aktivitätsgruppen in der Bevölkerung überprüft und gefunden, daß ungefähr 60% Paraoxon im Serum relativ langsam abbauen und es 34% mit mittlerer, 6% mit hoher Geschwindigkeit hydrolysieren.

Es besteht keine Abhängigkeit der Aktivität von Alter, Geschlecht, den Blutgruppen des ABO-Systems sowie des Rh-Systems.

Aus allen diesen Untersuchungen geht hervor, daß auch das Serum einen wesentlichen Anteil an den Entgiftungsprozessen des Paraoxons hat.

Dieser Anteil kann aber genetisch bedingt unterschiedlich sein.

In der Bevölkerung finden sich neben Personen mit mittlerer und hoher Serumparaoxonase-Aktivität etwa zur Hälfte solche mit sehr niedriger Paraoxonase-Aktivität, die beim Umgang mit Parathion (E 605) gefährdeter sind.

Es wäre hier besonders an Personen zu denken, die E 605 in der Land- und Forstwirtschaft oder in Heimgärten verwenden oder in der Produktion tätig sind.

Personen mit niedriger Serumparaoxonase-Aktivität sollten deshalb bei entsprechender Tätigkeit besonder sorgfältig überwacht werden.

Dabei bedeutet eine hohe Serumparaoxonase-Aktivität aufgrund der Spezifität des Enzyms wahrscheinlich keinen Schutz gegen andere Alkylphosphate mit Ausnahme von Methyl-E 605 und Chlorthion (GELDMACHER - v. MALLINCKRODT et al. 1973 b, FLÜGEL u. GELDMACHER - v. MALLINCKRODT 1978).

III. Problemstellung

Die bis heute bekannte Gruppeneinteilung der menschlichen Serum-Paraoxonase erfolgte aufgrund quantitativ bestimmter Aktivitätsunterschiede.

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war die Suche nach einem einfachen Test, welcher für die verschiedenen genetisch bedingten Paraoxonasetypen eine rasche qualitative Unterscheidung ermöglicht.

Wie KALOW et al. (1957a) berichten, sind für die Synthese der menschlichen Serum-Cholinesterase zwei unterschiedliche autosomale Gene ohne Dominanz nachweisbar, die als E^u_1 und E^a_1 bezeichnet werden. Das seltene atypische Gen E^a_1 , das eine Häufigkeit von 0,014 besitzt, induziert die Synthese einer Cholinesterase mit niedrigerer Aktivität, aber mit einer erhöhten Resistenz gegen Inhibition durch Verbindungen wie z.B. das Lokalanästhetikum Dibucain.

In einer weiteren Studie entwickelten KALOW et al. (1957 b) eine Klassifikationsmethode der menschlichen Serum-Cholinesterase, basierend auf der Inhibition der Benzoylcholinhydrolyse durch Dibucain. Mittels Bestimmung des Prozentsatzes der Inhibition (Dibucainnummer) konnten sie die Population in drei Phänotypen aufteilen.

Ungefähr 97% von den mit dieser Methode getesteten Personen haben einen normalen Genotypus ($E^u_1 E^u_1$) mit einer normalen Dibucainnummer von 76 bis 81. Ungefähr 3% gehören

zu der heterozygoten Zwischengruppe ($E^u_1 E^a_1$) mit einer Dibucainnummer von 55 bis 69. Diese Gruppe kann einen leichten Anstieg der Succinylcholinempfindlichkeit zeigen. Eine sehr geringe Anzahl gehört zu der atypischen homozygoten Gruppe ($E^a_1 E^a_1$) mit einer Dibucainnummer unter 21, einer niedrigen Pseudocholinesterase-Aktivität und einer starken Empfindlichkeit gegen Succinylcholin, die sich in einer verlängerten Apnoe nach der Verabreichung von derartigen Muskelrelaxantien bei der Narkose äußert. Die Häufigkeit dieser Gruppe beträgt 1 : 5100.

Nun wurde wiederholt versucht, die von KALOW et al. (1957 b) gefundenen drei genetisch bedingten Serumcholinesterase-Typen durch Natriumchlorid zu differenzieren.

So haben SWIFT und LA DU (1966) einen einfachen und schnellen Screeningtest zur Ermittlung von Personen, die eine atypische Cholinesterase besitzen, entwickelt, der auf der Tatsache beruht, daß Kochsalz die normale Pseudocholinesterase aktiviert, nicht jedoch das atypische Enzym. Der Test dient dazu, jene Menschen einfach selektieren zu können, die besonders empfindlich auf das Muskelrelaxans Succinylcholin reagieren. Der Test beruht auf einem Vergleich der Cholinesteraseaktivität von einem Paar von Testschalen - eine Schale enthält 0,125 molares Natriumchlorid, und die andere enthält kein Kochsalz. Phenolrot wird dabei als Indikator für die Benzoylcholinhydrolyse verwandt. Da die Rate der Benzoylcholinhydrolyse bei der atypischen

Pseudocholinesterase durch 0,125 molares Natriumchlorid nicht beeinflusst wird, entsteht bei Vorliegen dieses Enzyms in beiden Testschalen stets genausoviel Phenolrot. Alle Sera mit dem normalen Enzym oder dem Enzym mittlerer Aktivität zeigen in der Testschale mit 0,125 molarem Natriumchlorid eine größere Esteraseaktivität und damit stärkere Rotfärbung als in der Kontrollschale.

CLARK et al. (1969) untersuchten die Aktivität der menschlichen Cholinesterase spektrophotometrisch mit Benzoylcholin als Substrat. Auch sie fanden dabei, daß die Zugabe von Kochsalz bei den drei von KALOW et al. (1957) beschriebenen genetischen Typen unterschiedlich wirkt. Die Cholinesteraseaktivität aus dem Serum von Probanden mit dem normalen Genotypus kann durch Zugabe von Natriumchlorid gesteigert werden. Die höchste Aktivität - sie war dreimal so groß wie die Ausgangsaktivität ohne Kochsalz - wurde bei einer Natriumchloridkonzentration von 0,2 Mol/l erreicht.

Bei der Zugabe von höher konzentrierten Kochsalzlösungen wurde wiederum ein Absinken der Aktivität festgestellt. Die Aktivität der Cholinesterase aus dem Serum von Probanden der heterozygoten Zwischengruppe wurde durch Zugabe von Natriumchlorid nur halb so viel gesteigert wie bei Probanden mit der normalen Esterase. Die Aktivität des atypischen Enzyms wurde durch Kochsalzzugabe nicht gesteigert, es wurde nur eine Hemmung bei hohen Salzkonzentrationen beobachtet.

Zur Unterscheidung des normalen und des atypischen Enzyms führt WHITTAKER (1968) eine sogenannte "Chloridnummer" ein. Die Bestimmung dieser Chloridnummer beruht darauf, daß das atypische Enzym stärker durch Natriumchlorid gehemmt wird als das normale Enzym. WHITTAKER beobachtete, daß eine Konzentration von $5 \cdot 10^{-1}$ Mol/l Kochsalz die beste Unterscheidung zwischen dem normalen und dem atypischen Enzym erlaubt. Die Chloridnummer erweist sich als ebenso tauglich zur Differenzierung wie die Dibucainnummer von KALOW et al. (1957 b) und die Fluoridnummer von HARRIS und WHITTAKER (1961). Letztere berichten, daß auch Natriumfluorid als Inhibitor der Serumcholinesterase benutzt werden kann und eine gute Unterscheidung der drei Phänotypen ermöglicht. In ihrer Studie haben HARRIS und WHITTAKER (1961) festgestellt, daß in einigen wenigen Fällen die gemessene Fluoridnummer wesentlich kleiner war als die korrespondierende Dibucainnummer. Aus dieser Tatsache schlossen sie auf die Existenz eines dritten Allels. Obwohl dieses Gen eine niedrigere Frequenz als das bereits bekannte atypische Allel hat, wurden einige Versuchspersonen gefunden, die homozygot oder heterozygot hierfür waren.

Bei der Untersuchung, welchen Effekt die Zugabe von Natriumchlorid auf die Cholinesteraseaktivität hat, fanden HARRIS und WHITTAKER (1963), daß Konzentrationen von $< 10^{-2}$ Mol/l keinen Einfluß auf die Esteraseaktivi-

tät haben. Bei einer Steigerung der Kochsalzkonzentration von 10^{-2} Mol/l bis 2,5 Mol/l zeigte sich eine zunehmende Hemmung der Enzymaktivität. Bei allen Konzentrationen zwischen $5 \cdot 10^{-2}$ Mol/l und 2,5 Mol/l war die Aktivitätshemmung bei dem atypischen Enzym größer als beim normalen Enzym. Bei Zugabe von 2,5 molarer Kochsalzlösung war das atypische Enzym fast völlig gehemmt, während das normale Enzym nur zu 80% gehemmt war. Da bei Experimenten mit anderen Salzen wie $MgCl_2$, $CoCl_2$ und $MnCl_2$ ähnliche Ergebnisse wie bei Natriumchlorid beobachtet wurden, ist der oben beschriebene Effekt vermutlich auf die Ionenstärke der Lösung zurückzuführen, in der die enzymatische Reaktion stattfindet. Als Substrat wurde bei der spektrophotometrischen Bestimmung der Cholinesterase Benzoylcholin verwandt.

HUGGINS und LAPIDES (1947) stellen bei der Zugabe von Kochsalz in Konzentrationen zwischen 10^{-4} Mol/l und 10^{-2} Mol/l eine nur unwesentliche Steigerung der Aktivität der Cholinesterase fest. Bei höheren Natriumchloridkonzentrationen von 10^{-1} Mol/l bis 2 Mol/l zeigte sich eine stetig zunehmende Hemmung des Enzyms. Bei einer Kochsalzkonzentration von 1 Mol/l betrug die Aktivitätshemmung 82%.

KIMONYO (1978) hat geprüft, ob eine Gruppeneinteilung der menschlichen Serum-Paraoxonase durch unterschiedliche Hemmung mittels Natriumfluorid möglich ist. In ihrer Arbeit hat sie gezeigt, daß Natriumfluorid in

Glycin-Natronlauge-Puffer (pH 11,2) in Konzentrationen ab 10^{-3} Mol/l in der Lage ist, eine von der Natriumfluoridkonzentration abhängige Spaltung von Paraoxon zu bewirken. Dieser Effekt konnte nur als Katalyse gedeutet werden. Ohne Zusatz von Natriumfluorid in entsprechender Konzentration ist Paraoxon unter den angegebenen Bedingungen stabil, wie auch KRISCH (1968) zeigte.

Mit der vorliegenden Arbeit sollte nun geklärt werden, ob die beobachtete nicht enzymatische Spaltung des Paraoxons durch Natriumfluorid auf eine Natrium- oder auf eine Fluoridwirkung zurückzuführen ist.

KIMONYO (1978) zeigte weiter, daß Natriumfluorid unter Berücksichtigung der durch Natriumfluorid allein bewirkten Spaltung eine hemmende Wirkung auf die Paraoxon-Spaltung durch die Serumparaoxonase ausübt.

Ein unterschiedlicher Einfluß auf Vertreter der niedrigen und mittleren Aktivitätsgruppe ist nicht erkennbar. Für die hohe Aktivitätsgruppe könnte eine offensichtlich vorliegende Enzymhemmung schon ab 10^{-2} Mol/l Natriumfluorid ein brauchbares Differenzierungsmerkmal sein.

Den Einfluß von Natriumoxalat auf die Serumparaoxonaseaktivität untersuchte LIE (1979). In ihrer Arbeit zeigte sie, daß unter Verwendung des photometrischen Tests nach KRISCH (1968) bei Natriumoxalat-Konzentrationen, die höher als 10^{-3} Mol/l sind, eine Hemmung des Enzyms eintritt. Diese ist bei der niedrigen Aktivitätsgruppe am

geringsten und liegt zwischen 10% und 27%. Bei der mittleren Aktivitätsgruppe beträgt die Hemmung zwischen 51% und 64%, in der hohen Aktivitätsgruppe zwischen 68% und 69%. Als Grund für die Hemmung der Paraoxonase durch Natriumoxalat vermutet LIE, daß das Oxalat Calcium bindet, das für die Wirksamkeit des Enzyms wichtig ist.

Doch auch die Ergebnisse von LIE ergaben keine Möglichkeit, sicher zwischen den drei Serumparaoxonase-Gruppen zu unterscheiden.

Deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit geprüft werden, ob durch Natriumchlorid eine einfache Differenzierung der drei Paraoxonase-Gruppen möglich ist.

IV. Eigene Untersuchungen

A. Darstellung der Methodik und des Materials

Es wurde ein einfacher, kontinuierlicher photometrischer Test zur Messung der enzymatischen Hydrolyse von Paraoxon durch menschliches Serum nach KRISCH (1968) angewandt. Dabei wird die Extinktion des bei der Hydrolyse entstehenden p-Nitrophenol bei 405 nm photometrisch direkt in der Küvette gemessen, und das Ausmaß der Abspaltung von p-Nitrophenol in der Zeiteinheit dient als Maß für die Paraoxonaseaktivität. Bei der Freisetzung von p-Nitrophenol fällt eine zunehmende Gelbfärbung des Ansatzes auf.

Standard-Test

Lösungen

0,1 M Glycin-Natronlauge-Puffer (pH 11,2)

7,507 g Glycin abwiegen, etwa 900 ml dest. Wasser zugeben. So lange mit dem Magnetrührer rühren, bis alles gelöst ist. Unter ständigem Rühren einige Tropfen 35%ige Natronlauge zugeben, bis - mit dem pH-Meter geprüft - ein pH-Wert von 11,2 eingestellt ist. Dann die Lösung mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen.

Trispuffer (pH 8,0)

12,114 g TRIS (Tri-hydroxymethyl-amino-methan) abwiegen, etwa 900 ml dest. Wasser zugeben. So lange mit dem Magnetrührer rühren, bis alles TRIS gelöst ist. Unter ständigem

Rühren einige Tropfen 37%ige HCl zugeben, bis - mit dem pH-Meter geprüft - ein pH-Wert von 8,0 eingestellt ist. Dann wird die Lösung mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

E 600 - Stammlösung

($1,2 \cdot 10^{-2}$ M in 0,1 M Trispuffer pH 8,0)
0,26 ml E 600 (Paraoxon) in 100 ml Trispuffer (pH 8,0) geben, durch etwa 5 - 10 Minuten dauerndes mechanisches Schütteln (Mischgerät) mischen.

E 600 - Gebrauchslösung

Die E 600 - Stammlösung wird zum Gebrauch 1 : 5 mit dest. Wasser verdünnt.

z.B. 10 ml E 600 - Stammlösung + 40 ml dest. Wasser

Serum

Das Serum ist aus Venenblut gewonnen. Für die Bestimmung wurde es 1 : 5 mit 0,9%iger Kochsalzlösung verdünnt.

z.B. 1 ml Serum + 4 ml 0,9%ige Kochsalzlösung

Die Lösungen in entsprechenden Mengen (z.B. je 3,3 ml Glycin-Natronlauge-Puffer pH 11,2) wurden in Reagenzgläsern im Wasserbad auf 25° C gebracht.

Ansatz

In ein Reagenzglas werden pipettiert:

- 3,3 ml Glycin-Natronlauge-Puffer (pH 11,2)
- 0,5 ml 1 : 5 verdünntes Serum
- 1,0 ml E 600 - Gebrauchslösung

Nach Durchmischen wird ein Anteil der Lösung in eine Küvette (Schichtdicke 1 cm) eingegossen.

Messung

Nach Durchmischen mit einem unten abgeflachten Glasstab wird in Abständen von 30 Sekunden die Extinktion bei 405 nm und $t = 25^{\circ}$ am Photometer abgelesen. Ausgewertet wird die Extinktionsdifferenz 180 s minus 30 s. Vom Meßwert wird der unter entsprechenden Bedingungen gemessene Leerwert (ohne Serum; statt Serum 0,9%ige Kochsalzlösung) abgezogen.

Berechnung

Zur Umrechnung der Extinktionskoeffizienten in nMol wird der molare Extinktionskoeffizient von p-Nitrophenol (in Glycin-NaOH-Puffer pH 11,2) bei 405 nm = $18,05 \cdot 10^6 \text{ cm}^2 \cdot \text{Mol}^{-1}$ zugrunde gelegt.

10 nMol p-Nitrophenol gelöst in 1 ml haben danach bei $d = 1 \text{ cm}$ und $\lambda = 405 \text{ nm}$ eine Extinktion von 0,1805.

Unter weiterer Berücksichtigung der Serumverdünnung (Umrechnung auf ml Serum durch Multiplikation mit 10), der Meßzeit (Umrechnung auf 1 Min. durch Division durch 2,5) und des Ansatzvolumens (= 4,8 ml, Multiplikation mit 4,8) errechnet sich die Aktivität nach folgender Formel:

$$\begin{aligned}\text{Aktivität} &= \frac{\Delta E \cdot 10 \cdot 4,8 \cdot 10}{0,1805 \cdot 2,5} \\ &= \Delta E \cdot 1063 \text{ (U/l)}\end{aligned}$$

Photometrischer Test zur Ermittlung des Einflusses von Kochsalz auf die enzymatische Spaltung von E 600 durch Serum nach KRISCH (1968):

Lösungen

- Kochsalz in Glycin-NaOH-Puffer (pH 11,2)

Kochsalz : NaCl M = 58,44

Es wurden Glycin-NaOH-Puffer-Lösungen (pH 11,2) mit unterschiedlicher NaCl-Konzentration hergestellt.

$6,6 \cdot 10^{-1}$ M	Kochsalz entspricht 3,86 g NaCl in 100 ml Glycin-NaOH-Puffer (pH 11,2)
$5 \cdot 10^{-1}$ M	Kochsalz entspricht 2,92 g NaCl in 100 ml Glycin-NaOH-Puffer (pH 11,2)
$4 \cdot 10^{-1}$ M	Kochsalz entspricht 2,34 g NaCl in 100 ml Glycin-NaOH-Puffer (pH 11,2)
$3 \cdot 10^{-1}$ M	Kochsalz entspricht 1,75 g NaCl in 100 ml Glycin-NaOH-Puffer (pH 11,2)
$2 \cdot 10^{-1}$ M	Kochsalz entspricht 1,17 g NaCl in 100 ml Glycin-NaOH-Puffer (pH 11,2)
10^{-1} M	Kochsalz entspricht 0,58 g NaCl in 100 ml Glycin-NaOH-Puffer (pH 11,2)
10^{-2} M	Kochsalz entspricht 10 ml 10^{-1} M NaCl ad 100 ml mit Glycin-NaOH-Puffer (pH 11,2)
10^{-3} M	Kochsalz entspricht 10 ml 10^{-2} M NaCl ad 100 ml mit Glycin-NaOH-Puffer (pH 11,2)
10^{-4} M	Kochsalz entspricht 10 ml 10^{-3} M NaCl ad 100 ml mit Glycin-NaOH-Puffer (pH 11,2)
10^{-5} M	Kochsalz entspricht 10 ml 10^{-4} M NaCl ad 100 ml mit Glycin-NaOH-Puffer (pH 11,2)

Der pH-Wert aller Lösungen wurde nach dem Zusetzen von Kochsalz noch einmal kontrolliert. Er betrug stets 11,2.

- E 600 - Stammlösung

siehe oben

- E 600 - Gebrauchslösung

siehe oben

- Serum

siehe oben

Die Lösungen in entsprechenden Mengen (z.B. je 3,3 ml Glycin-NaOH-Puffer mit unterschiedlicher NaCl-Konzentration) wurden in Reagenzgläsern im Wasserbad auf 25° C gebracht.

Ansatz

In ein Reagenzglas werden pipettiert:

- 3,3 ml Glycin-NaOH-Puffer mit unterschiedlicher NaCl-Konzentration (pH 11,2)
- 0,5 ml 1 : 5 verdünntes Serum
- 1,0 ml E 600 - Gebrauchslösung

Nach Durchmischen wird ein Anteil der Lösung in eine Küvette (Schichtdicke 1 cm) eingegossen.

Messung

Die Messungen werden unter den gleichen Bedingungen wie oben beschrieben durchgeführt.

Berechnung

Die Berechnung der Aktivität erfolgt nach der Formel:

$$\text{Aktivität} = \Delta E \cdot 1063 \text{ U/l}$$

B. Versuchsergebnisse

1. Präzision

Zunächst wurde die Präzision des in dem Abschnitt "Methodik" angegebenen Verfahrens bestimmt.

Es wurde für ein Serum mit einer Paraoxonase-Aktivität von 241,5 U/l zehnmal die Aktivität gemessen und dann die Standardabweichung (s) und der Variationskoeffizient (Vk) bestimmt.

Die Ergebnisse der Messung sind in Tab. 1 wiedergegeben.

Tabelle 1:

Ermittlung der Präzision für die Messung der enzymatischen Spaltung von Paraoxon durch Serum nach KRISCH (1968)

Extinktion E nach		ΔE	Aktivität U/l
30 s	180 s		
0,09	0,315	0,225	239
0,09	0,31	0,22	234
0,07	0,30	0,23	245
0,06	0,29	0,23	245
0,05	0,275	0,225	239
0,03	0,26	0,23	245
0,03	0,26	0,23	245
0,02	0,245	0,225	239
0,03	0,255	0,225	239
0,01	0,24	0,23	245

Aus den gefundenen Werten berechnet man:

$$\begin{aligned}\text{Mittelwert: } \bar{x} &= \frac{\sum x_i}{n} \\ &= 241,5 \text{ (U/l)}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Standardabweichung: } s &= \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \\ &= 3,98\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Variationskoeffizient: } V_k &= \frac{s \cdot 100}{\bar{x}} \% \\ &= 1,65 \%\end{aligned}$$

Bei einer 10-fachen Bestimmung des gleichen Serums wurde ein Mittelwert von $241,5 \pm 3,98$ U/l gefunden.

Die Standardabweichung (s) beträgt 3,98.

Da die Standardabweichung von der Größe des Mittelwertes abhängig ist, sind die errechneten Werte bei den verschiedenen Analyseverfahren nicht vergleichbar.

Eine vergleichende Aussage erlaubt die relative Standardabweichung (auch als Variationskoeffizient V_k bezeichnet), bei der die Standardabweichung in Relation zum Mittelwert angegeben wird.

Der Variationskoeffizient ist hier 1,65 %. Der methodische Fehler ist also im Vergleich zur individuellen biologischen Streuung der Aktivitäten gering.

2. Prüfung eines Einflusses von Kochsalz allein auf die Paraoxon-Spaltung

Hierbei wurde unter gleichen Bedingungen, wie im Kapitel "Methodik" beschrieben, die Abspaltung von p-Nitrophenol aus Paraoxon gemessen mit dem Unterschied, daß anstelle der Serumverdünnung eine entsprechende Menge physiologische Kochsalzlösung im Ansatz verwendet wurde.

Hierdurch konnte geprüft werden, ob die Zugabe von Natriumchlorid in den angegebenen Konzentrationen im Ansatz einen Einfluß auf die Hydrolyse von Paraoxon hat.

Zum Vergleich dienten Ansätze mit Glycin-Natronlauge-Puffer ohne Zusatz von Natriumchlorid, wobei gleichfalls statt Serum 0,9%ige Kochsalzlösung im Ansatz enthalten war.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 und 3 wiedergegeben.

Tabelle 2:

Eigenhydrolyse von Paraoxon im Ansatz nach KRISCH (1968)

Glycin-NaOH-Puffer ohne Zusatz	Extinktion E nach		ΔE
	30 s	180 s	
	0,18	0,18	0
	0,185	0,185	0
	0,18	0,19	0,01
	0,19	0,2	0,01
	0,185	0,19	0,005
	0,18	0,19	0,01
	0,19	0,2	0,01
	0,2	0,21	0,01
	0,2	0,21	0,01
	0,195	0,205	0,01

Tabelle 3:

Einfluß von Natriumchlorid in verschiedenen Konzentrationen auf die Eigenhydrolyse von Paraoxon

NaCl-Konzentration in Glycin-NaOH-Puffer (Mol/l)	Extinktion E nach		ΔE
	30 s	180 s	
10^{-5}	0,18	0,18	0
	0,185	0,185	0
10^{-4}	0,18	0,18	0
	0,18	0,18	0
10^{-3}	0,185	0,195	0,01
	0,19	0,195	0,005
10^{-2}	0,19	0,2	0,01
	0,2	0,21	0,01
10^{-1}	0,19	0,2	0,01
	0,195	0,2	0,005
$2 \cdot 10^{-1}$	0,185	0,195	0,01
	0,19	0,2	0,01
$3 \cdot 10^{-1}$	0,195	0,2	0,005
	0,2	0,21	0,01
$4 \cdot 10^{-1}$	0,2	0,21	0,01
	0,205	0,215	0,01
$5 \cdot 10^{-1}$	0,2	0,205	0,005
	0,2	0,21	0,01
$6,6 \cdot 10^{-1}$	0,2	0,21	0,01
	0,2	0,21	0,01

Wie aus Tab. 2 hervorgeht, ergeben sich auf Grund der Eigenhydrolyse von Paraoxon bei pH 11,2 ohne Serum nur niedrige Extinktionsdifferenzen (ΔE in 150 Sekunden = 0,01), die rechnerisch bei der Ermittlung der in Tab. 4 wiedergegebenen Aktivitäten berücksichtigt werden.

Aus Tab. 3 erkennt man, daß die Zugabe von Natriumchlorid im Ansatz keinen Einfluß auf die nicht enzymatische Hydrolyse des E 600 hat.

3. Ermittlung des Einflusses von Kochsalz auf die enzymatische Spaltung von Paraoxon durch menschliches Serum, gemessen nach KRISCH (1968)

Die Untersuchungen wurden bei insgesamt 15 Personen mit verschiedenen Serum-Paraoxonase-Aktivitäten durchgeführt, und zwar bei 5 Personen mit niedriger Aktivität

5 Personen mit mittlerer Aktivität

5 Personen mit hoher Aktivität

Die Zuordnung der Seren erfolgte dabei entsprechend GELDMACHER - v. MALLINCKRODT et al. (1973 a):

niedriger Typ	30 - 190 U/l
mittlerer Typ	190 - 350 U/l
hoher Typ	über 350 U/l

Bei den je 5 Versuchspersonen in jeder Gruppe ergaben sich die in Tab. 4 zusammengefaßten Ergebnisse.

Tabelle 4:

Der Einfluß von Natriumchlorid auf die Aktivität der menschlichen Serum-Paraoxonase

Natriumchlorid-Konz. in Glycin-NaOH-Puffer (Mol/l)	Enzymaktivität U/l	in Prozent der Ausgangsaktivität
--	-----------------------	----------------------------------

a) niedriger Typ

1. Schricker	29 J.	Aktivität 73 U/l
10^{-5}	72	98%
10^{-4}	74	101%
10^{-3}	72	98%
10^{-2}	77	105%
10^{-1}	74	101%
$2 \cdot 10^{-1}$	72	98%
$3 \cdot 10^{-1}$	69	94%
$4 \cdot 10^{-1}$	64	87%
$5 \cdot 10^{-1}$	61	83%
$6,6 \cdot 10^{-1}$	58	80%

NaCl-Konzentration in	Enzymaktivität	
Glycin-NaOH-Puffer		
(Mol/l)	U/l	in Prozent der Ausgangsaktivität

2. Lie, Mei Lan	32 J.	Aktivität 77 U/l
-----------------	-------	------------------

10^{-5}	77	100%
10^{-4}	74	97%
10^{-3}	74	97%
10^{-2}	77	100%
10^{-1}	77	100%
$2 \cdot 10^{-1}$	77	100%
$3 \cdot 10^{-1}$	74	97%
$4 \cdot 10^{-1}$	72	93%
$5 \cdot 10^{-1}$	69	90%
$6,6 \cdot 10^{-1}$	63	82%

3. Merklein, Bernhard	43 J.	Aktivität 113 U/l
-----------------------	-------	-------------------

10^{-5}	109	96%
10^{-4}	114	101%
10^{-3}	112	99%
10^{-2}	114	101%
10^{-1}	114	101%
$2 \cdot 10^{-1}$	109	96%
$3 \cdot 10^{-1}$	101	89%
$4 \cdot 10^{-1}$	93	82%
$5 \cdot 10^{-1}$	90	80%
$6,6 \cdot 10^{-1}$	85	75%

NaCl-Konzentration in Glycin-NaOH-Puffer (Mol/l)	Enzymaktivität U/l	in Prozent der Ausgangsaktivität
--	-----------------------	----------------------------------

4. Zach, Ludwig 26 J. Aktivität 115 U/l

10^{-5}	114	99%
10^{-4}	114	99%
10^{-3}	112	97%
10^{-2}	114	99%
10^{-1}	112	97%
$2 \cdot 10^{-1}$	109	94%
$3 \cdot 10^{-1}$	106	92%
$4 \cdot 10^{-1}$	104	90%
$5 \cdot 10^{-1}$	101	88%
$6,6 \cdot 10^{-1}$	96	83%

5. Rexin, Burkhard 28 J. Aktivität 160 U/l

10^{-5}	162	101%
10^{-4}	162	101%
10^{-3}	160	100%
10^{-2}	162	101%
10^{-1}	162	101%
$2 \cdot 10^{-1}$	154	94%
$3 \cdot 10^{-1}$	144	89%
$4 \cdot 10^{-1}$	136	84%
$5 \cdot 10^{-1}$	130	81%
$6,6 \cdot 10^{-1}$	120	75%

NaCl-Konzentration in Glycin-NaOH-Puffer (Mol/l)	Enzymaktivität U/l	in Prozent der Aus- gangsaktivität
--	-----------------------	---------------------------------------

b) mittlerer Typ

1. Ruisinger, Franz 27 J. Aktivität 209 U/l

10^{-5}	207	98%
10^{-4}	205	98%
10^{-3}	209	100%
10^{-2}	210	101%
10^{-1}	209	100%
$2 \cdot 10^{-1}$	202	97%
$3 \cdot 10^{-1}$	194	93%
$4 \cdot 10^{-1}$	167	80%
$5 \cdot 10^{-1}$	152	72%
$6,6 \cdot 10^{-1}$	128	61%

2. Weisser, Hans-Jürgen 28 J. Aktivität 249 U/l

10^{-5}	245	98%
10^{-4}	249	100%
10^{-3}	250	100%
10^{-2}	245	98%
10^{-1}	252	101%
$2 \cdot 10^{-1}$	244	98%
$3 \cdot 10^{-1}$	231	93%
$4 \cdot 10^{-1}$	199	80%
$5 \cdot 10^{-1}$	178	71%
$6,6 \cdot 10^{-1}$	140	56%

NaCl-Konzentration in Glycin-NaOH-Puffer (Mol/l)	Enzymaktivität	
	U/l	in Prozent der Ausgangsaktivität

3. Holländer, Karl 27 J. Aktivität 261 U/l

10^{-5}	260	100%
10^{-4}	255	98%
10^{-3}	262	100%
10^{-2}	264	101%
10^{-1}	258	99%
$2 \cdot 10^{-1}$	253	97%
$3 \cdot 10^{-1}$	238	91%
$4 \cdot 10^{-1}$	215	83%
$5 \cdot 10^{-1}$	205	78%
$6,6 \cdot 10^{-1}$	165	63%

4. Pitter, Roland 28 J. Aktivität 271 U/l

10^{-5}	273	101%
10^{-4}	275	101%
10^{-3}	268	99%
10^{-2}	271	100%
10^{-1}	269	99%
$2 \cdot 10^{-1}$	266	98%
$3 \cdot 10^{-1}$	250	92%
$4 \cdot 10^{-1}$	231	85%
$5 \cdot 10^{-1}$	204	75%
$6,6 \cdot 10^{-1}$	175	65%

NaCl-Konzentration in Glycin-NaOH-Puffer (Mol/l)	Enzymaktivität U/l	in Prozent der Aus- gangsaktivität
--	-----------------------	---------------------------------------

5. Dr. Mackbert, Günter 44 J. Aktivität 330 U/l

10^{-5}	327	99%
10^{-4}	321	97%
10^{-3}	329	100%
10^{-2}	332	101%
10^{-1}	330	100%
$2 \cdot 10^{-1}$	321	97%
$3 \cdot 10^{-1}$	306	93%
$4 \cdot 10^{-1}$	247	75%
$5 \cdot 10^{-1}$	226	68%
$6,6 \cdot 10^{-1}$	198	60%

c) hoher Typ

1. Kimonyo, Jeannie 30 J. Aktivität 401 U/l

10^{-5}	398	99%
10^{-4}	401	100%
10^{-3}	401	100%
10^{-2}	406	101%
10^{-1}	403	101%
$2 \cdot 10^{-1}$	384	96%
$3 \cdot 10^{-1}$	347	87%
$4 \cdot 10^{-1}$	287	72%
$5 \cdot 10^{-1}$	236	59%
$6,6 \cdot 10^{-1}$	182	45%

NaCl-Konzentration in Glycin-NaOH-Puffer (Mol/l)	Enzymaktivität U/l	in Prozent der Aus- gangsaktivität
--	-----------------------	---------------------------------------

2. Steiger, Norbert 25 J. Aktivität 440 U/l

10^{-5}	443	101%
10^{-4}	439	100%
10^{-3}	441	100%
10^{-2}	446	101%
10^{-1}	439	100%
$2 \cdot 10^{-1}$	428	97%
$3 \cdot 10^{-1}$	369	84%
$4 \cdot 10^{-1}$	319	72%
$5 \cdot 10^{-1}$	263	60%
$6,6 \cdot 10^{-1}$	211	48%

3. Geldmacher, Herbert 63 J. Aktivität 485 U/l

10^{-5}	478	99%
10^{-4}	480	99%
10^{-3}	481	99%
10^{-2}	476	98%
10^{-1}	483	100%
$2 \cdot 10^{-1}$	483	100%
$3 \cdot 10^{-1}$	372	77%
$4 \cdot 10^{-1}$	300	62%
$5 \cdot 10^{-1}$	275	57%
$6,6 \cdot 10^{-1}$	197	41%

NaCl-Konzentration in Glycin-NaOH-Puffer (Mol/l)	Enzymaktivität U/l	in Prozent der Aus- gangsaktivität
--	-----------------------	---------------------------------------

4. Dietrich, Hans Georg 30 J. Aktivität 528 U/l

10^{-5}	529	100%
10^{-4}	534	101%
10^{-3}	521	99%
10^{-2}	531	101%
10^{-1}	529	100%
$2 \cdot 10^{-1}$	516	98%
$3 \cdot 10^{-1}$	493	93%
$4 \cdot 10^{-1}$	407	77%
$5 \cdot 10^{-1}$	377	71%
$6,6 \cdot 10^{-1}$	287	54%

5. Burger, Brigitte 25 J. Aktivität 560 U/l

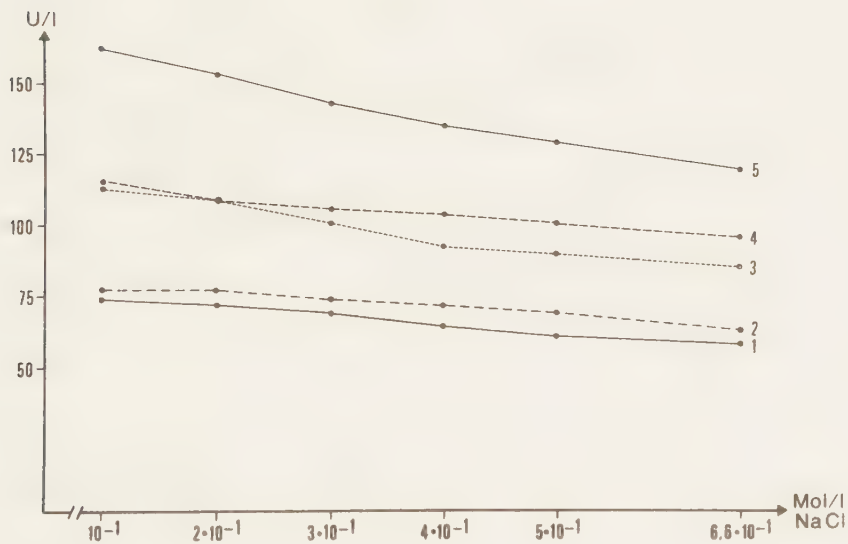
10^{-5}	555	99%
10^{-4}	561	100%
10^{-3}	561	100%
10^{-2}	558	100%
10^{-1}	561	100%
$2 \cdot 10^{-1}$	542	97%
$3 \cdot 10^{-1}$	486	87%
$4 \cdot 10^{-1}$	409	73%
$5 \cdot 10^{-1}$	343	61%
$6,6 \cdot 10^{-1}$	269	48%

Die in Tab. 4 genannten Werte sind in Abb. 6a-c graphisch dargestellt, wobei jeweils (A) die absolute Aktivität und (B) die relative Aktivität, bezogen auf die Ausgangsaktivität = 100%, in Abhängigkeit von der Kochsalzkonzentration wiedergibt.

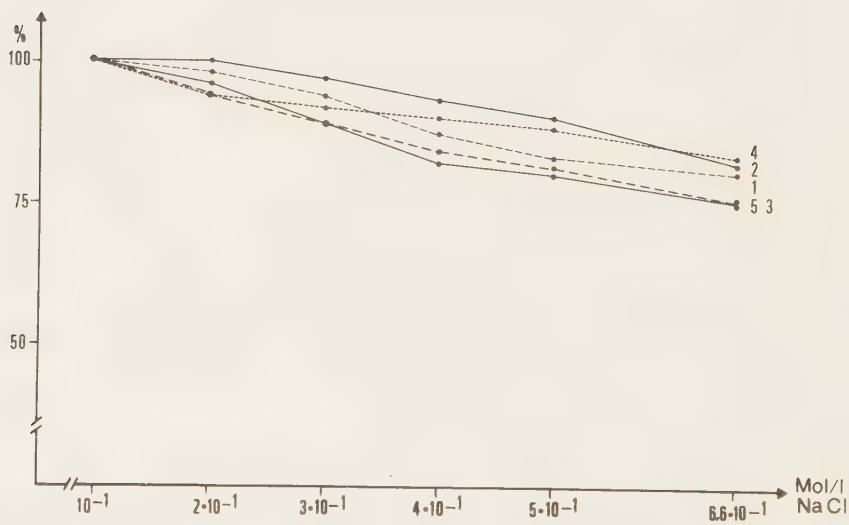
Abb. 6: Hydrolytische Spaltung von Paraaxon
im Ansatz nach KRISCH (1968) bei Zusatz
von Natriumchlorid

a) niedrige Paraaxonase-Aktivität

(α)

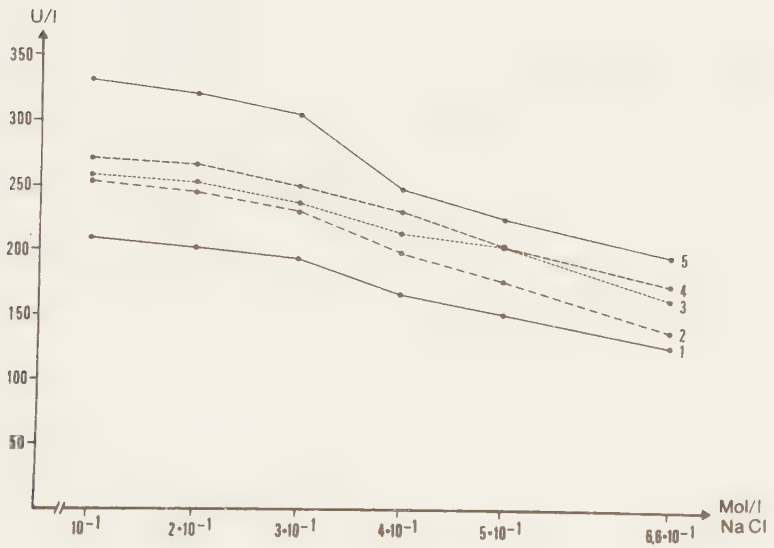


Ⓐ

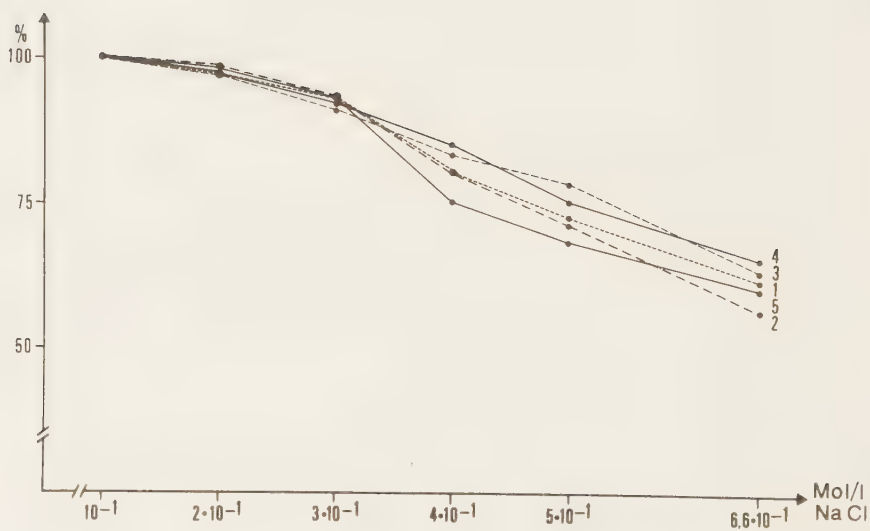


b) mittlere Paraoxonase-Aktivität

α

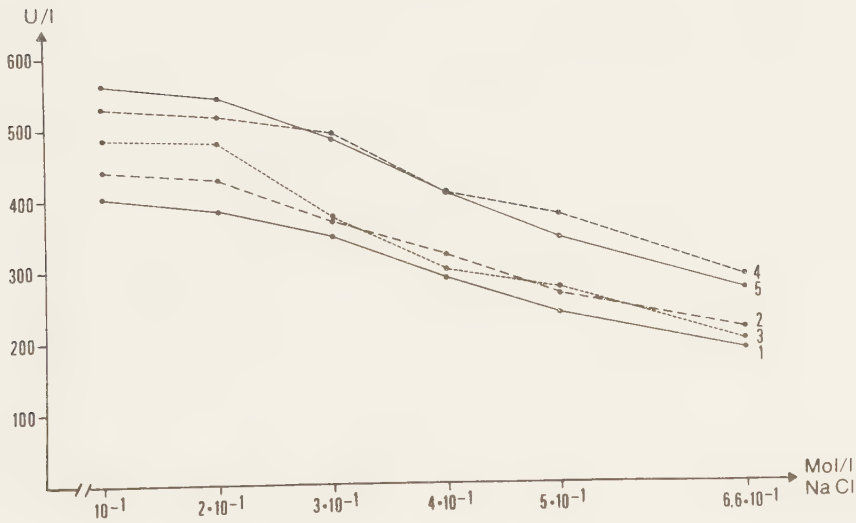


⒑

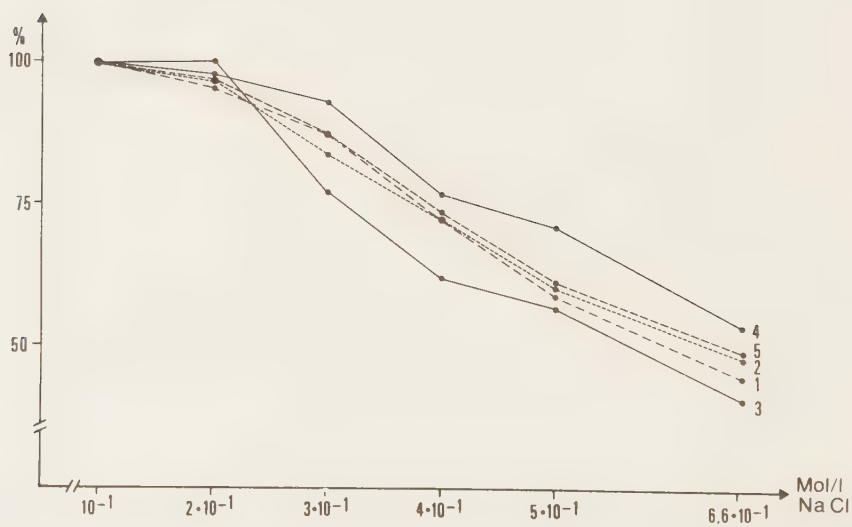


c) hohe Paraoxonase-Aktivität

α



β



V. Diskussion und Zusammenfassung

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, daß unter den Bedingungen der Bestimmung der Paraoxonaseaktivität nach KRISCH (1968) Natriumchlorid in Glycin-Natronlauge-Puffer in Konzentrationen bis $2 \cdot 10^{-1}$ Mol/l keinen Einfluß auf die Enzymaktivität hat. Bei Kochsalzkonzentrationen von über $2 \cdot 10^{-1}$ Mol/l tritt eine Hemmung der Enzymaktivität auf. Diese nimmt mit steigender Natriumchlorid-Konzentration zu. Bei der höchsten verwendeten Konzentration von $6,6 \cdot 10^{-1}$ Mol/l Natriumchloridlösung in Glycin-Natronlauge-Puffer beträgt die Enzymhemmung in der niedrigen Aktivitätsgruppe zwischen 17% und 25%, in der mittleren zwischen 35% und 44% und in der hohen zwischen 46% und 59%.

Die Hemmung der Paraoxonase war also bei allen Sera der hohen Aktivitätsgruppe größer als bei Sera der mittleren und dort wiederum größer als bei Sera der niedrigen Aktivitätsgruppe.

Eine Differenzierung der drei Paraoxonase-Typen ist jedoch durch Natriumchlorid nicht sicherer möglich als durch die Bestimmung der Ausgangsaktivität ohne Kochsalzzusatz. Der von KIMONYO (1978) beschriebene Effekt der Katalyse der nicht enzymatischen Hydrolyse von Paraoxon durch Natriumfluorid darf vermutlich als Fluorideffekt gedeutet werden, da er bei keiner der untersuchten Natriumchloridkonzentrationen auftrat.

Die Hemmung der Paraoxonaseaktivität durch Zusatz von hohen Kochsalzkonzentrationen ($> 2 \cdot 10^{-1}$ M) zum Glycin-Natronlauge-Puffer im Verfahren nach KRISCH (1968) kann auf eine Änderung der Enzymstruktur durch die zunehmende Ionenstärke zurückgeführt werden, wie dies HARRIS und WHITTAKER (1963) bei der Serumcholinesterase beschrieben haben.

VI. Literaturverzeichnis

1. ALDRIDGE, W.N.:

Serum esterases. 1. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenylacetate, -propionate and -butyrate, and a method for their determination.
Biochem. J. 53, 110 (1953 a)

2. ALDRIDGE, W.N.:

Serum esterases. 2. An enzyme, hydrolysing diethyl-p-nitrophenylphosphate (E 600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera.
Biochem. J. 53, 117 (1953 b)

3. CLARK, S.W., GLAUBIGER, G.A., LA DU, B.N.:

Properties of plasma cholinesterase variants
Ann. Ny. Acad. Sci. 151, 710 (1969)

4. DUMBACH, J.:

Statistische Analyse zur Genetik der menschlichen Serumparaoxonase (EC 3.1.1.2)
Dissertation Erlangen 1976

5. FLÜGEL, M., GELDMACHER - v. MALLINCKRODT, M.

Zur Kinetik des Paraoxon-spaltenden Enzyms im menschlichen Serum (EC 3.1.1.2)
Klin. Wochenschr. 56, 911 (1978)

6. GELDMACHER - v. MALLINCKRODT, M., LINDORF, H.H.,
PETENYI, M., FLÜGEL, M., FISCHER, Th., HILLER, Th.:
Genetisch determinierter Polymorphismus der menschlichen Serum-Paraoxonase (EC 3.1.1.2)
Humangenetik 17, 331 (1973 a)
7. GELDMACHER - v. MALLINCKRODT, M., PENETYI, M.,
METZNER, H., BURGIS, H., DIETZEL, B., NIRSCHL, H.,
RENNER, O.:
Zur Spezifität der menschlichen Serum-Paraoxonase
Z. Physiol. Chem. 354, 337 (1973 b)
8. HARRIS, H., WHITTAKER, M.:
Differential inhibition of human serum cholinesterase
with fluorid: Recognition of two new phenotypes
Nature 191, 496 (1961)
9. HARRIS, H., WHITTAKER, M.:
Differential inhibition of usual and atypical serum
cholinesterase by NaCl and NaF
Ann. Hum. Genet., Lond. 27, 53 (1963)
10. HUGGINS, Ch., LAPIDES, J.:
Chromogenic substrates. 4. Acyl esters of p-nitrophenol
as substrates for the colorimetric determination of
esterase.
J. Biol. Chem. 170, 467 (1947)

11. KALOW, W., STARON, N.:

On distribution and inheritance of atypical forms of human serum cholinesterase, as indicated by dibucain numbers.

Can. J. Biochem. Physiol. 35, 1305 (1957 a)

12. KALOW, W. GENEST, K.:

A method for the detection of atypical forms of human serum cholinesterase. Determination of dibucain numbers.

Can. J. Biochem. Physiol. 35, 339 (1957 b)

13. KIMONYO, J.:

Einfluß von Natriumfluorid auf die hydrolytische und enzymatische Spaltung von Paraoxon

(E 600,O,O-Diäthyl-O-p-nitrophenyl-phosphat)

Dissertation Erlangen 1978

14. KRISCH, K.:

Enzymatische Hydrolyse von Diäthyl-p-nitrophenyl-phosphat durch menschliches Serum.

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 6, 41 (1968)

15. LIE, M.L.:

Einfluß von Natriumoxalat auf die hydrolytische und enzymatische Spaltung von Paraoxon

(E-600,O,O-Diäthyl-O-p-nitrophenyl-phosphat)

Dissertation Erlangen 1979

16. NEAL, R.A.:
Enzymic mechanism of metabolism of the phosphorothioate insecticides
Arch. Intern. Med. 128, 118 (1971)
17. POORE, R.E., NEAL, R.A.:
Evidence for extrahepatic metabolism of parathion
Toxicol. Appl. Pharmacol. 23, 759 (1972)
18. SWIFT, M.R., LA DU, B.N.:
A rapid screening test for atypical serum-cholinesterase.
Lancet 1, 513 (1966)
19. WHITTAKER, M.:
The pseudocholinesterase variants. Differentiation by means of sodium chloride
Acta genet. Basel 18, 556 (1968)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Frau Professor Dr. Dr. M. Geldmacher-v.Mallinckrodt für die Überlassung des Themas, ihre außergewöhnlich große Hilfsbereitschaft und den zu jeder Zeit so freundlich erteilten Rat recht herzlich danken.

Herrn Professor Dr. H.-B. Wuermeling, Vorstand des Instituts für Rechtsmedizin der Universität Erlangen-Nürnberg, danke ich herzlich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Herrn Opitz bin ich für die große Hilfe bei der Anfertigung der graphischen Darstellungen zu tiefem Dank verpflichtet.

Lebenslauf

Personalien: Hans-Jürgen Weisser

geb. 7. März 1951

in Friedberg/Bayern

Eltern: Josef Weisser, Färbermeister

Elisabeth Weisser, geb. Ölkrug

Ausbildung: 1957-1961 Volksschule in Friedberg

1961-1970 Peutingergymnasium in Augsburg

1970 Abitur

1971-1976 Studium der Medizin an der
Universität Erlangen-Nürnberg

1973 ärztliche Vorprüfung

1976 ärztliche Prüfung

1976 Promotion zum Dr.med.

1978 Approbation als Arzt

1971-1979 Studium der Zahnmedizin an der
Universität Erlangen-Nürnberg

1973 zahnärztliche Vorprüfung

1979 zahnärztliche Prüfung

1979 Bestallung als Zahnarzt

Druck: D. Gräbner, 8602 Altendorf - Tel. 09545 / 8791